

**Título: IDENTIFICAÇÃO DE *BORDETELLA PERTUSIS* E *BORDETELLA PARAPERTUSIS* USANDO *REAL-TIME PCR* E ANÁLISE DA CURVA DE *MELT***

**Autores:** Odelta dos Santos Allende<sup>1</sup>, Giovana Regina Weber Hoss<sup>1</sup>, Denise S Menezes<sup>1</sup>, Elisa Costabeber<sup>1</sup>, Juliana di Paoli<sup>1</sup>, Rodrigo Minuto Paiva<sup>1</sup>, Jéssica Lacerda Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Alegretti<sup>1</sup>.

**Instituição:** <sup>1</sup> Hospital de Clinicas de Porto Alegre- HCPA – Porto Alegre – RS.

**Resumo:** *Bordetella pertussis* e *Bordetella parapertussis* são  $\beta$ -proteobactérias gram-negativas que colonizam as vias respiratórias de mamíferos. A infecção por *B. pertussis* apresenta-se como doença aguda, caracterizada por tosse, bronquite com complicações que podem resultar em pneumonia, convulsões e encefalopatia. A doença causada por *B. parapertussis*, por sua vez, é mais leve. Geralmente os adultos e os adolescentes atuam como reservatório dessas bactérias, uma vez que a vacinação na infância protege por um período limitado. A contaminação de crianças não vacinadas pode levar à morte, sendo necessário um rápido diagnóstico para que seja isolada a fonte de infecção e estabelecido o tratamento precoce. Padronizar a técnica de PCR em tempo real para diferenciar *B. pertussis* e *B. parapertussis* por meio da curva de dissociação ou *melting curve*, utilizando o intercalante *BRYT Green® dye*. Foram utilizados dois pares de *primers* específicos para amplificação simultânea das regiões *IS481a* da *B. pertussis* (140pb) e *IS1001* em *B. parapertussis* (107pb). A curva de concentração de *primers* foi executada com 0,3uM, 0,4uM e 0,5uM. Posteriormente, foi determinada a eficiência da reação por meio da diluição seriada de base 10, partindo de 1000 cópias de DNA comercial. O padrão comercial de DNA foi utilizado, também, para determinar o limite de detecção do teste. Já a reação de PCR foi realizada com 6,5uL de GoTaq® qPCR Master Mix-Promega, 0,5uM de cada um dos *primers* e 100ng de DNA genômico, resultando em um volume final de 12uL. A temperatura de anelamento foi de 60°C e a especificidade dos fragmentos amplificados foi avaliada por meio da temperatura de *Melt* e por gel de agarose (2%). Para a validação do método foram escolhidos, aleatoriamente, no banco de amostras positivas do Laboratório de Biologia Molecular do HCPA, nove (9) amostras de *B. pertussis* e sete (7) de *B. parapertussis*. Os resultados da PCR-RT foram confirmados por sequenciamento considerado padrão-ouro. A concentração de *primer* com menor valor de *Ct* e sem formação de anelamentos inespecíficos foi de 0,5uM. A eficiência da reação ficou dentro dos limites aceitáveis (E 99%,  $R^2$  0,99; *slope* -3,36). A amplificação de *B. pertussis* e *B. parapertussis* gerou temperaturas de *Melt* (*Tm*) diferentes, ou seja, de 88,6 °C e de 83,5°C, respectivamente. A nítida diferença de *Tm* obtidas para *B. pertussis* e para *B. parapertussis* permitiu detectar fragmentos específicos de duas espécies de *Bordetella* em um único produto de PCR. Por fim, a sensibilidade analítica de detecção do teste foi de 10 cópias/uL. A PCR-RT permitiu identificar duas espécies de *Bordetella* em uma única reação. Essa abordagem apresentou vantagens, tais como o menor custo do intercalante *BRYT Green® dye*, facilitando a execução do teste e uma maior rapidez na liberação do resultado.

**Palavras-chaves:** *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *BRYT Green® dye*, PCR em Tempo Real.